

0- 790392

На правах рукописи



Федорова Елена Сергеевна

**БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ МОНИТОРИНГ ПРОЦЕССОВ
ДЕТОКСИКАЦИИ РАСТВОРОВ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ**

03.01.02 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Пушино – 2011

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институте биофизики
СО РАН, г. Красноярск

Научный руководитель: доктор физико-математических наук, проф.
Кудряшева Надежда Степановна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, в.н.с.
Трубецкой Олег Анатольевич

доктор биологических наук, в.н.с.
Векшин Николай Лазаревич

Ведущая организация: Биологический факультет Московского Государственного
Университета им. М.В. Ломоносова

Защита диссертации состоится 24 ноября 2011 г. в 12⁰⁰ час. на заседании
диссертационного совета Д 002.066.01 при Учреждении Российской академии наук
Институте фундаментальных проблем биологии РАН по адресу: 142290, г. Пушкино,
ул. Институтская, д.2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИФПБ РАН по адресу: 142290,
г. Пушкино, ул. Институтская, д.2.

Автореферат разослан 22 октября 2011 г.

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА КГУ



0000662928

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Г.Н. Назарова'.

Г.Н. Назарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Свечение организмов, биолюминесценция, основано на хемилюминесцентных ферментативных реакциях. В результате этих реакций формируются молекулы эмиттеров в электронно-возбужденных состояниях, дезактивирующиеся с испусканием кванта света видимого диапазона.

Биолюминесценция морских бактерий чрезвычайно чувствительна к присутствию токсичных соединений. Именно поэтому биолюминесцентные системы уже более 40 лет используются в качестве биотестов для мониторинга токсичности различных сред (Гительзон и др., 2002; Girotti et al., 2008). Регистрируемый параметр физиологической активности – интенсивность свечения. Механизмы воздействия токсичных соединений на биолюминесцентные реакции многообразны; их можно условно разделить на физические, химические и биохимические (Kudryasheva, 2006).

Биолюминесцентные биотесты, основанные на люминесцентных бактериях, характеризуются надежностью, высокой скоростью анализа (1-5 мин), чувствительностью, воспроизводимостью результатов, возможностью приборной регистрации и количественной оценки токсичности. Кроме того, возможность использования биолюминесцентных систем различной сложности (люминесцентные бактерии и выделенные ферменты) позволяет сравнивать эффекты на клеточном и биохимическом уровнях.

Биолюминесцентные биотесты чрезвычайно перспективны для использования в ремедиационных мероприятиях при оценке степени детоксикации сточных и природных вод.

Известно, что в природных условиях деградация поллютантов связана с воздействием ряда факторов физической, химической и биологической природы – воздействием оптического излучения видимого и УФ-диапазонов, химических агентов природного происхождения, микроорганизмов. Одной из важнейших групп веществ, выполняющих роль природных химических детоксикантов, являются гуминовые вещества – продукты окислительного разложения и полимеризации органических веществ в почве и водных отложениях (Орлов, 1992). Исследование воздействия указанных факторов на растворы модельных поллютантов позволяет понять механизмы процессов, протекающих в окружающей среде, а также использовать выявленные закономерности при осуществлении ремедиационных мероприятий. Использование биолюминесцентных биотестов позволяет решить эту задачу.

Выбор объекта исследования связан с тем, что фенольные соединения и их окисленные формы – хиноны – являются наиболее распространенными органическими поллютантами. Эти вещества производятся в значительных объемах и

попадают в окружающую среду в составе промышленных стоков (Холодкевич и др., 1996).

Цель исследования – изучение влияния детоксицирующих факторов (гуминовых веществ, УФ-облучения и биологических агентов) на токсичность водных растворов органических соединений – хинонов и фенолов – с помощью биолюминесцентных тестовых систем.

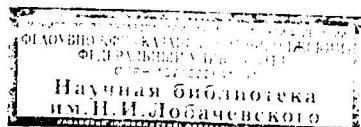
В работе поставлены следующие задачи:

1. Продемонстрировать возможности использования биолюминесцентных тестовых систем для оценки эффективности детоксикации растворов модельных органических поллютантов гуминовыми веществами, УФ-облучением и биологическим агентом.
2. Выявить закономерности влияния гуминовых веществ на токсичность растворов ряда редокс-активных органических соединений – хинонов и фенолов с различными окислительно-восстановительными свойствами.
3. На примере растворов фенолов сравнить действие гуминовых веществ, УФ-облучения и биологических агентов, а также комбинации этих факторов на токсичность растворов органических поллютантов.

Научная новизна. Биолюминесцентные тестовые системы впервые использованы для оценки эффективности детоксикации растворов органических соединений – хинонов и фенолов – гуминовыми веществами, УФ-облучением, биологическими агентами и комбинацией этих факторов. Продемонстрирована окислительно-восстановительная активность гуминовых веществ в растворах ряда хинонов и фенолов. Показано, что гуминовые вещества способны усиливать защитный ответ клетки на воздействие токсикантов. На примере растворов фенолов показано, что эффективность детоксикации растворов варьируется при изменении длины волны облучения и комбинации факторов.

Положения, выносимые на защиту.

1. Применимость биолюминесцентного метода для оценки эффективности детоксикации растворов органических соединений гуминовыми веществами, УФ-облучением и биологическими агентами.
2. Окислительно-восстановительная активность гуминовых веществ в растворах ряда органических окислителей и восстановителей – хинонов и фенолов.
3. Варьирование эффективности детоксикации различными факторами (УФ облучением, обработкой гуминовыми веществами и биологическими агентами) при изменении длины волны облучения и комбинации факторов.



Практическая значимость. Предлагаемые исследования являются основой для разработки биолюминесцентных методик мониторинга процессов детоксикации растворов органических поллютантов в природных условиях под действием природных детоксицирующих агентов – гуминовых веществ, облучения светом УФ и видимого диапазона, биологических агентов. Установленные закономерности обеспечивают возможность подбора условий для детоксикации растворов органических токсикантов при ремедиационных мероприятиях.

Апробация работы. Основные результаты работы докладывались и обсуждались на XII Международной конференции молодых ученых “Ломоносов” (Москва, 2005), VII Международной школе-семинаре по актуальным проблемам физики, технологии и инновациям (Томск, 2005), 13-м Съезде Международного гуминового общества (Германия, Карлсруэ, 2006), VIII Международном симпозиуме “Сложные системы в экстремальных условиях” (Красноярск, 2006), конференции “Социально-экологические проблемы природопользования в Центральной Сибири” (Красноярск, 2006), XII Международном симпозиуме по люминесцентной спектроскопии (Испания, Луго, 2006), XVI Международном симпозиуме по биолюминесценции и хемилюминесценции (Франция, Лион, 2010).

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования РФ REC-002 KR-006; ЦЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» по теме Биолюминесцентный анализ: биосенсоры и биокаталитические технологии; РФФИ-ККФН (N 05-03-977-01); программы РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 7 статей в реферируемых журналах, 14 тезисов конференций. Получен патент Российской Федерации.

Личный вклад автора состоял в проведении всех экспериментов, обработке и обсуждении экспериментальных данных. Препараты интактных и лиофилизированных бактерий произведены в лаборатории бактериальной биолюминесценции ИБФ СО РАН. Приготовление образцов для электронно-микроскопического исследования и интерпретация результатов этих исследований проведены под руководством Могильной О.А (лаборатория бактериальной биолюминесценции ИБФ СО РАН). Электронно-микроскопические исследования проводились в Лимнологическом институте СО РАН г. Иркутска, изучение фотоиндуцированной детоксикации фенолов – в Томском Государственном Университете. Основная часть результатов была получена в сотрудничестве с

Кузнецовым А.М., Могильной О.Н., Стомом Д.И., Сизых А.Г., Белым А.Г., Тарасовой А.С., Чайковской О.Н., Соколовой И.В., Каретниковой Е.В., Светличным В.А., Брянцевой Н.Г. Вклад соавторов отражен в публикациях. Автор приносит благодарность всем коллегам за участие в совместных работах и обсуждении результатов.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, двух глав с изложением результатов работы, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 117 страницах машинописного текста, проиллюстрирована 4 таблицами и 28 рисунками. Библиография включает 172 источника.

Обозначения:

ГВ – гуминовые вещества

I – интенсивность биолюминесценции, мВ

I_0 – контрольное значение интенсивности биолюминесценции в отсутствии органических веществ, мВ

I_F – интенсивность биолюминесценции при воздействии детоксицирующего фактора, мВ

C_{50}, M – концентрация органического соединения при $I/I_0 = 0,5$

$C_{ГВ}$ – концентрация ГВ, г/л.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе диссертации рассмотрены принципы функционирования, структура и свойства бактериальных люминесцентных систем и их использование в биотестировании. Обсуждаются механизмы действия экзогенных соединений на биолюминесцентные системы. Приводится обзор литературы по строению и свойствам ГВ; особое внимание уделено предпосылкам использования их в качестве природных детоксикантов. Рассмотрена проблема совместного действия на экотоксиканты ГВ-в, УФ-излучения, биологических агентов. Охарактеризованы модельные органические соединения, которые используются для изучения процессов детоксикации растворов органических соединений. Обоснованы преимущества использования биолюминесцентных систем различной сложности для мониторинга процессов детоксикации органических соединений.

Вторая глава диссертации посвящена описанию материалов и методов исследования. В работе использовали три биолюминесцентные системы: (1) интактные бактерии – клеточная суспензия культуры бактерий *Photobacterium phosphoreum* 1883 IBSO из коллекции Института биофизики СО РАН, (2) препарат микробиотест 677F, изготовленный на основе лиофилизированных светящихся

бактерий *P.phosphoreum* 1883 IBSO, (3) комплект реактивов аналитической биолюминесценции, который включает лиофилизированные препараты бактериальной люциферазы и НАД(Р)Н:ФМН-оксидоредуктазы.

В качестве модельных органических токсикантов использовали хиноны и фенолы (Sigma-Aldrich, США).

Источником гуминовых веществ служил препарат “Гумат-80” (ООО “Гумат”, г. Иркутск, Россия). Препарат получен механохимической реакцией бурого окисленного угля (Черемховское месторождение, Россия) со щелочью (KOH, NaOH).

Коэффициент детоксикации (K), характеризующий изменение токсичности растворов токсикантов под действием детоксицирующих факторов (ГВ, УФ-излучения, биологических агентов), показывает, во сколько раз увеличивается интенсивность биолюминесценции при действии детоксицирующего фактора F :

$$K = (I/I_0)_F / (I/I_0) = (I)_F / I$$

где I/I_0 – относительная интенсивность биолюминесценции в растворе соединения (хинона или фенола); $(I/I_0)_F$ – относительная интенсивность биолюминесценции при воздействии детоксицирующего фактора в растворе органического соединения (хинона или фенола); I и $(I)_F$ – соответствующие абсолютные значения интенсивностей биолюминесценции. Величины $K > 1$ соответствуют детоксикации раствора, $K = 1$ – отсутствию эффекта, $K < 1$ – увеличению токсичности. Ошибка расчетов величин K составляла 10%.

Все величины интенсивности биолюминесценции скорректированы на оптический “эффект фильтра”.

В качестве источников УФ излучения для фотохимических исследований использовали ртутную УФ лампу со стеклянным фильтром БС-8, который выделяет часть спектра короче 350 нм, а также новые современные источники — импульсные эксиплексные лампы барьерного разряда U-типа на рабочих молекулах $KrCl^*$ ($\lambda_{изл} = 222$ нм) и $HeCl^*$ ($\lambda_{изл} = 308$ нм) с параметрами $\Delta\lambda = 5\text{—}10$ нм, $W_{пик} = 18$ мВт/см², $f = 200$ кГц, длительность импульса 1 мкс (Tarasenko et al., 1999).

Использовали рабочие концентрации ГВ, ингибирующие биолюминесценцию не более, чем на 10%: $C_{ГВ} < 0,25$ г/л для лиофилизированных и интактных бактерий, $C_{ГВ} < 0,005$ г/л для лиофилизированного препарата бактериальной люциферазы и НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазы.

Третья глава посвящена изучению влияния ГВ на токсичность органических окислителей – хинонов с различными окислительно-восстановительными характеристиками. Для трех биолюминесцентных систем определены значения C_{50}

хинонов, а также интервалы концентраций ГВ-в, при которых наблюдалась детоксикация растворов хинонов, рассчитаны величины K .

В таблице 1 приведены характеристики влияния ГВ на растворы хинонов, определенные с использованием лиофилизированных бактерий и ферментативной системы.

Таблица. 1.

Характеристики влияния ГВ на растворы хинонов: $\Delta C_{ГВ}$ – интервал концентраций ГВ, при которых наблюдается детоксирующий эффект, K – максимальный коэффициент детоксикации, E^0 – стандартный окислительно-восстановительный потенциал хинона.

Тестовая система Хинон	Леофилизированные бактерии			Ферментативная система			$E^0, В$
	$C_{50}, М$	$\Delta C_{ГВ}, г/л$	K	$C_{50}, М$	$\Delta C_{ГВ}, г/л$	K	
тетрафтор-1,4-бензохинон	$9 \cdot 10^{-8}$	$10^{-3} \div 9 \cdot 10^{-2}$	2,1	$1,6 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-4} \div 10^{-3}$	1,7	0,840
1,4-бензохинон	$9 \cdot 10^{-7}$	$10^{-3} \div 10^{-2}$	1,7	10^{-4}	$3 \cdot 10^{-4} \div 10^{-3}$	1,4	0,712
метил-1,4-бензохинон	$4 \cdot 10^{-7}$	$10^{-2} \div 2 \cdot 10^{-1}$	1,4	10^{-4}	$4 \cdot 10^{-4} \div 10^{-3}$	1,2	0,656
тетраметил-1,4-бензохинон	$2 \cdot 10^{-5}$	нет эффекта	1,0	$1,3 \cdot 10^{-3}$	нет эффекта	1,0	0,400
1,4-нафтохинон	$5 \cdot 10^{-7}$	нет эффекта	0,9	$4,1 \cdot 10^{-4}$	нет эффекта	1,1	0,480

Из Таблицы 1 видно, при использовании лиофилизированных бактерий в качестве тестовой системы, для растворов тетрафтор-1,4-бензохинона, 1,4-бензохинона, метил-1,4-бензохинона $K > 1$, что указывает на детоксикацию этих растворов ГВ-ами. Не обнаружено влияния ГВ на растворы тетраметил-1,4-бензохинона и 1,4-нафтохинона.

Аналогичные изменения величин K получены при использовании в качестве биотеста биферментной системы НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза – люцифераза. Детоксирующий эффект в ферментативной системе наблюдался лишь при предварительном инкубировании хинонов с ГВ-ми. Зависимости величин K от времени инкубирования хинонов с ГВ не обнаружено как для ферментативной системы, так и для лиофилизированных бактерий.

Обнаружены линейные зависимости между значениями K и стандартными редокс-потенциалами хинонов, E^0 . Коэффициенты корреляции Пирсона, равные 0,99

и 0,96 для лиофилизированных бактерий и ферментативной системы соответственно, подтверждают наличие таких зависимостей. Данный результат указывает на связь детоксицирующего эффекта ГВ-в с окислительной способностью хинонов. За восстановительную активность ГВ-в в процессах детоксикации хинонов могут отвечать гидрохиноновые, фенольные, спиртовые, а также некоторые азотсодержащие группы макромолекул ГВ-в.

Известно, что для хинонов характерны переходы из окисленного в восстановленное состояние (Потапов и Татаринчик, 1989), причем, восстановленные формы (гидрохиноны) менее токсичны. Так, ПДК 1,4-дигидроксибензола (гидрохинона) равна 0,2 мг/л, а 1,4-бензохинона – $5 \cdot 10^{-5}$ мг/л. Поэтому одним из вероятных механизмов детоксикации представляется переход хинонов в восстановленную форму в присутствии ГВ. Для проверки этого предположения было проведено сравнение спектров поглощения хинонов до и после взаимодействия с ГВ. В качестве примера на рисунке 1а приведены спектры поглощения тетрафтор-1,4-бензохинона до и после взаимодействия с ГВ-вами. На рисунке 1б показаны спектры поглощения этого хинона до и после взаимодействия с неорганическим восстановителем – сульфитом натрия (Na_2SO_3).

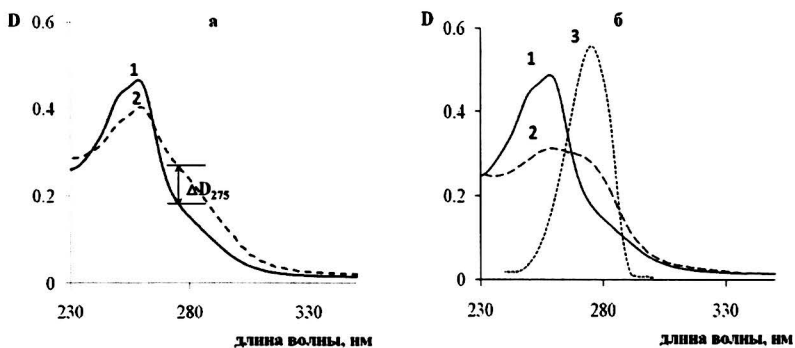


Рис.1. Спектры поглощения тетрафтор-1,4-бензохинона ($C = 3 \cdot 10^{-5} \text{M}$).

(а): 1 – до взаимодействия с ГВ, 2 – после взаимодействия с ГВ ($C_{\text{ГВ}} = 0,9 \cdot 10^{-2} \text{ г/л}$); (б): 1 – до взаимодействия с Na_2SO_3 , 2 – после взаимодействия с Na_2SO_3 ($C = 0,9 \cdot 10^{-4} \text{ M}$), 3 – раствор тетрафтор-1,4-гидрохинона ($C = 10^{-2} \text{M}$).

Из рисунка.1а видно, что спектр водного раствора тетрафтор-1,4-бензохинона изменяется при взаимодействии с ГВ. При этом оптическая плотность в максимуме поглощения хинона ($\lambda = 257 \text{ nm}$) уменьшается; а в области длин волн 270-290 нм,

соответствующей поглощению восстановленной формы этого хинона с максимумом 275 нм (Рис.1б, спектр 3), растет.

Из сравнения рисунков 1а и 1б видно, что аналогичное изменение спектров наблюдалось и при восстановлении этого хинона неорганическим восстановителем. Таким образом, сравнение этих двух рисунков также указывает на восстановительную активность ГВ в растворах хинона.

На рисунке 2 представлены спектры поглощения тетраметил-1,4-бензохинона, токсичность которого, как видно таблицы 1, ГВ-ами снижена не была. Видно, что спектры поглощения этого раствора при добавлении ГВ и сульфита натрия не изменяются. Вероятно, этот хинон из-за относительно низкого окислительно-восстановительного потенциала (см. Таблицу 1) в условиях эксперимента не восстанавливается ни сульфитом натрия, ни ГВ-ами.

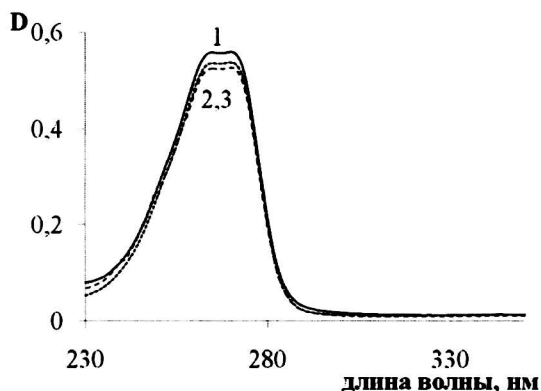


Рис.2. Спектры поглощения тетраметил-1,4-бензохинона ($C=2 \cdot 10^{-5} M$): 1 – исходный; 2 – после взаимодействия с ГВ ($C_{ГВ}=0,9 \cdot 10^{-2} г/л$); 3 – после взаимодействия с Na_2SO_3 ($C=0,9 \cdot 10^{-4} M$).

На рисунке 3 представлена зависимость изменения оптической плотности раствора тетрафтор-1,4-бензохинона на длине волны 275 нм (ΔD_{275}) от концентрации ГВ-в. На этом же рисунке приведена зависимость интенсивности биолюминесценции бактерий в присутствии тетрафтор-1,4-бензохинона от концентрации ГВ – $(I/I_0)_F$. Выбрана концентрация тетрафтор-1,4-бензохинона, ингибирующая биолюминесценцию на 50%, $(I/I_0)_F = 0,5$). Из рисунка видно, что максимальные величины $(I/I_0)_F$ и ΔD_{275} наблюдались в одном и том же интервале концентраций ГВ – около $10^{-2} г/л$.

Таким образом, полученные результаты подтверждают, что детоксицирующая способность ГВ-в в растворах хинонов связана с их восстановительными свойствами ГВ-в.

Для изучения возможных изменений в ультраструктуре бактерий в процессе детоксикации ГВ-ми было проведено электронно-микроскопическое исследование ультратонких срезов *P.phosphoreum*, подвергшихся действию хинонов в присутствии ГВ. Выбраны два хинона: тетрафтор-1,4-бензохинон и тетраметил-1,4-бензохинон, которые, как показано выше, характеризовались максимальными и минимальными величинами K при использовании двух тестовых систем (см. Таблицу 1).

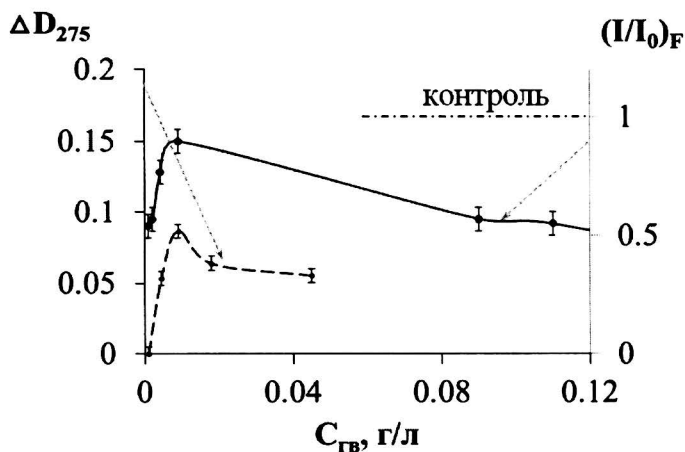


Рис.3. Зависимость ΔD_{275} и $(I/I_0)_F$ в растворе тетрафтор-1,4-бензохинона от концентрации ГВ ($C_{ГВ}$, г/л). Здесь ΔD_{275} – изменение оптической плотности раствора тетрафтор-1,4-бензохинона на длине волны 275 нм, $(I/I_0)_F$ – интенсивность биолуминесценции бактерий в растворе тетрафтор-1,4-бензохинона при добавлении ГВ.

Предварительно было исследовано влияние ГВ на токсичность растворов тетрафтор-1,4-бензохинона и тетраметил-1,4-бензохинона с использованием интактных бактерий *P.phosphoreum* в качестве биотеста. Были определены коэффициенты детоксикации K , которые оказались равными 2,1 и 1,0 для тетрафтор-1,4-бензохинона и тетраметил-1,4-бензохинона соответственно. Величины этих коэффициентов практически совпали с соответствующими коэффициентами, полученными с помощью лиофилизированных бактерий

P.phosphoreum (см. Таблицу 1). Это говорит о том, что лиофилизированные и интактные бактерии *P.phosphoreum* обладают близкой чувствительностью к действию хинонов.

Проведено исследование контрольного образца бактериальной культуры без хинонов (Рис.4а). При этом различий между клетками, обработанными и не обработанными ГВ-ами, обнаружено не было.

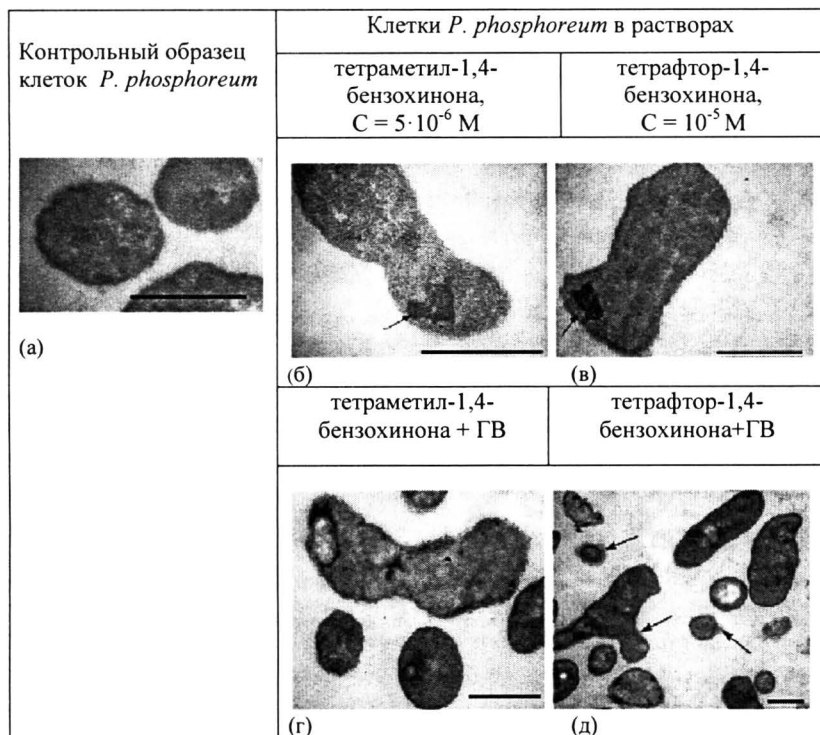


Рис.4. Ультраструктура клеток *P. phosphoreum*, $C_{ГВ} = 0,9 \cdot 10^{-2}$ г/л. Масштаб 1 мкм.

Результаты электронно-микроскопического исследования бактерий, подвергшихся воздействию тетраметил-1,4-бензохинона и тетрафтор-1,4-бензохинона показаны на рисунках 4б и 4в соответственно. Обнаружено, что характер изменений, вызванных влиянием двух хинонов, не отличался. В обоих случаях, бактерии были плеоморфной формы, клеточная стенка имела сглаженный профиль, в нуклеоплазме видны конденсированные нити ДНК. В клетках выявлялись электронно-плотные образования неправильной формы,

расположенные в цитоплазме у полюсов клетки (указаны стрелками на рисунках 4б и 4в).

После обработки бактериальной культуры хинонами и ГВ-ами (Рис.4г и Рис.4д) наблюдались изменения в строении клеточной оболочки: она становилась более плотной, внешняя мембрана клеточной стенки приобретала волнистый профиль, наблюдались остатки слизистого слоя капсулы (указаны стрелками на рисунке 4д). Особенно ярко эти изменения были видны у бактерий, подвергшихся обработке тетрафтор-1,4-бензохиноном и ГВ (Рис. 4д).

Известно, что появление слизистой капсулы является ответом клетки на неблагоприятное воздействие (Costerton, 1988). Слизистая капсула защищает бактерию от антимикробных агентов, и она практически всегда наблюдается на поверхности клеток, растущих в природных условиях (противоположно бактериям, выращенным в лабораторных условиях). В нашем случае, бактерии могли усилить синтез межклеточного слизистого слоя под действием ГВ в растворе тетрафтор-1,4-бензохинона.

Таким образом, гуминовые вещества усиливали ответ клетки на неблагоприятное воздействие тетрафтор-1,4-бензохинона.

В главе 4 изложены результаты влияния ГВ-в, УФ и видимого света, биологического агента на токсичность растворов органических восстановителей – фенолов.

Сравнение детоксицирующей способности ГВ в растворах хинонов и соответствующих им дифенолов (гидрохинонов)

На рис.5 представлены структурные формулы исследованных дифенолов и соответствующих им окисленных форм – хинонов. Проведено сравнение влияния ГВ на эти соединения (Табл.2).

Из таблицы 2 видно, что, как в ряду хинонов, так и в ряду фенолов, коэффициенты детоксикации (K) связаны со стандартным редокс-потенциалом пары хинон-фенол (E^0). Для хинонов наблюдается прямая зависимость, а для фенолов – обратная. Вероятно, гуминовые вещества проявляют восстановительную активность в растворах органических окислителей (хинонов) и окислительную активность в растворах органических восстановителей – фенолов.

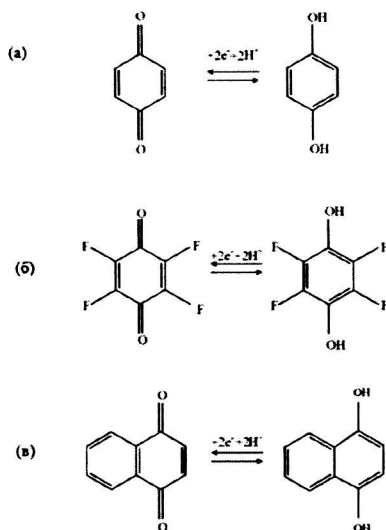


Рис.5. Редокс пары хинон-дифенол: а) 1,4-бензохинон – 1,4-дигидрохинон б) тетрафтор-1,4-бензохинон – тетрафтор-1,4-дигидрохинон в) 1,4-нафтохинон – 1,4-нафтодигидрохинон.

Таблица 2.

Коэффициенты детоксикации (K) для растворов дифенолов и соответствующих им хинонов. Тестовая система – сопряженная система ферментативных реакций.

Хиноны	K	Дифенолы	K	$E^0, В$
Тетрафтор-1,4-бензохинон	1,7	Тетрафтор-1,4-дигидрохинон	1,0	0,840
1,4-бензохинон	1,4	1,4-дигидрохинон	1,2	0,712
1,4-нафтохинон	1,1	1,4-нафтодигидрохинон	2,1	0,480

Сравнение влияния различных детоксицирующих факторов на растворы фенолов

Исследовано влияние ГВ и УФ-излучения на токсичность водных растворов фенолов (гидроксibenзола и *пара*-крезола). Проанализированы изменения спектров флуоресценции растворов фенолов. Изменение токсичности растворов оценивали

коэффициентами детоксикации K этих растворов, рассчитанных с помощью биолюминесцентного биотеста на лиофилизированных бактериях.

На рисунке 6 представлены спектры флуоресценции раствора фенола (гидроксibenзола) в отсутствии и присутствии ГВ. Как видно из рисунка, максимальная интенсивность полосы флуоресценции водного раствора фенола в присутствии ГВ (кривая 4) ниже в 15 раз по сравнению с раствором фенола без ГВ (кривая 1); смещения максимума полосы флуоресценции фенола при этом не наблюдалось. После воздействия УФ-облучения происходит падение интенсивности основной полосы флуоресценции фенола с максимумом 296 нм, что указывает на фотолиз фенола. Причем, эффективность фотопревращения фенола без ГВ при облучении 308 нм и >350 нм мала (кривые 2 и 3, Рис. 6). Наиболее эффективно фотолиз раствора фенола без ГВ протекает под действием излучения эксилампы с $\lambda_{\text{изл}} = 222$ нм (кривая 8, Рис. 6), а в присутствии ГВ – под действием ртутной лампы с фильтром БС-8 ($\lambda_{\text{изл}} > 350$ нм) (кривая 7, Рис.6).

Из рисунка 6 следует, что интенсивность флуоресценции продуктов фотопревращения фенола в присутствии ГВ и без них различаются (например, кривые 2 и 7). Это указывает на то, что механизмы фотопревращений фенола в присутствии и отсутствии ГВ различны.

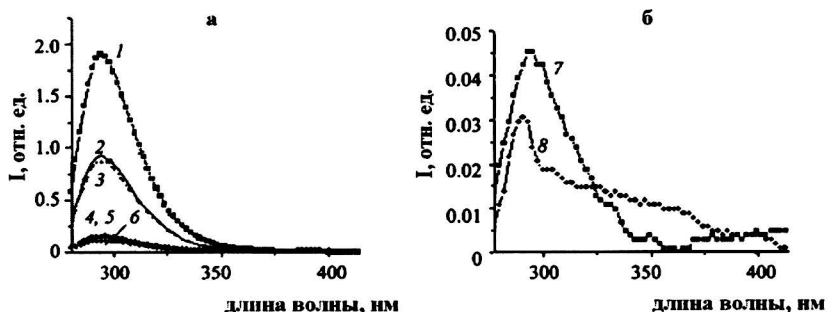


Рис. 6. Спектры флуоресценции раствора фенола ($\lambda_{\text{возб}}=280$ нм): 1 – исходный раствор фенола без ГВ и облучения, 2 – после воздействия излучения ртутной лампы с фильтром БС-8 ($\lambda_{\text{изл}} > 350$ нм); 3 – после воздействия УФ излучения эксилампы ($\lambda_{\text{изл}} = 308$ нм); 4 – с добавлением ГВ; 5 – с ГВ после воздействия УФ излучения эксилампы ($\lambda_{\text{изл}} = 222$ нм); 6 – с ГВ после воздействия УФ излучения эксилампы ($\lambda_{\text{изл}} = 308$ нм); 7 – с ГВ после воздействия излучения ртутной лампы с фильтром БС-8 ($\lambda_{\text{изл}} > 350$ нм); 8 – после воздействия УФ излучения эксилампы ($\lambda_{\text{изл}} = 222$ нм).

В случаях максимальной эффективности фоторазложения фенола (кривые 7 и 8, Рис.6б), необходимо учитывать, что при облучении эксилампой с $\lambda_{\text{мэл}} = 222$ нм происходит прямой фотолиз фенола (кривая 8), а при облучении $\lambda_{\text{мэл}} > 350$ нм в присутствии ГВ (кривая 7) – фотоиндуцированный, не связанный с прямым фотовозбуждением фенола.

Вместе с тем, фоторазложение фенола в растворе не является свидетельством уменьшения токсичности его раствора. Нельзя исключать возможности повышения токсичности в результате образования продуктов фотолиза в растворах сложного состава. Использование биолуминесцентных бактерий в качестве биотеста позволяет оценить интегральную токсичность до и после фотолиза и сравнить эффективность детоксикации.

На рисунке 7 показаны результаты оценки токсичности растворов фенола: приведены величины относительной интенсивности биолуминесценции $(I/I_0)_F$ (где F – детоксицирующий фактор или комбинация факторов), а также величины K . Представлены $(I/I_0)_F$ раствора фенола до облучения (столбцы 1 и 5) и после облучения $\lambda_{\text{мэл}} > 350$ нм, $\lambda_{\text{мэл}} = 222$ нм, $\lambda_{\text{мэл}} = 308$ нм.

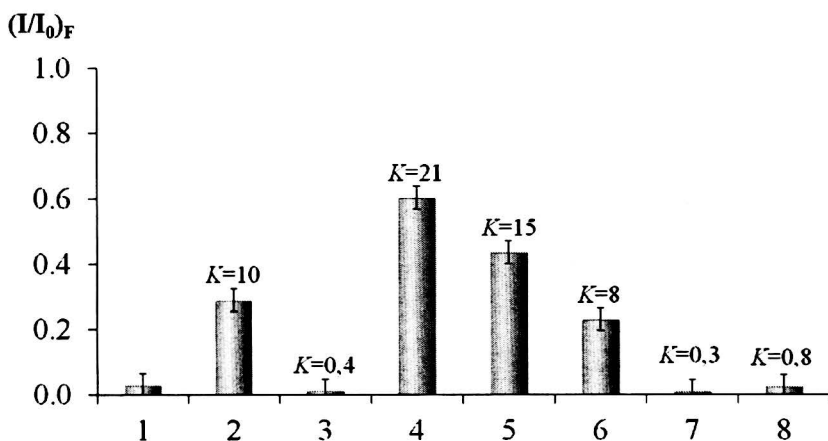


Рис.7. Интенсивность биолуминесценции $(I/I_0)_F$ и коэффициенты детоксикации K водных растворов фенола ($C=4 \cdot 10^{-5}$ М) без ГВ (1–4) и в присутствии ГВ (5–8): 1, 5 – необлученные растворы; 2, 6 – после воздействия $\lambda_{\text{мэл}} > 350$ нм; 3, 7 – после воздействия $\lambda_{\text{мэл}} = 222$ нм; 4, 8 – после воздействия $\lambda_{\text{мэл}} = 308$ нм.

Присутствие фенола подавляет интенсивность биолуминесценции бактерий по сравнению с контрольным образцом $(I/I_0 = 0,05)$ (столбец 1, Рис.7), что

демонстрирует токсичность раствора фенола. При облучении раствора фенола светом $\lambda_{\text{изл}} > 350$ нм и $\lambda_{\text{изл}} = 308$ нм наблюдается увеличение интенсивности биолюминесценции (столбцы 2 и 4, Рис.7). Это говорит о снижении токсичности данных растворов. Максимальное значение $K = 21$ соответствует раствору фенола, облученного $\lambda_{\text{изл}} = 308$ нм. Несмотря на то, что по флуоресцентным данным под действием $\lambda_{\text{изл}} = 222$ нм происходит наиболее эффективное фоторазложение фенола (Рис.6), интенсивность биолюминесценции для этого раствора оказалась даже ниже, чем для необлученного (столбец 3 и 1 соответственно, Рис.7), что говорит об увеличении токсичности раствора ($K = 0,4$), вероятно, из-за образования токсичных продуктов фоторазложения.

Добавление ГВ в необлученный водный раствор фенола детоксицирует раствор ($K=15$, столбец 5, Рис.7). Облучение раствора фенола с ГВ всеми источниками излучения приводит к уменьшению величин $(I/I_0)_F$ и K по отношению к необлученному раствору (столбцы 6–8 и 5 соответственно, Рис.7). Вероятно, продукты фотолиза в системе фенол+ГВ, являются токсичными для тестовой системы. При облучении светом $\lambda_{\text{изл}} > 350$ нм добавление ГВ слабо влияет на токсичность растворов фенола (столбцы 2 и 6, Рис.7).

Таким образом, наиболее эффективная фотоиндуцированная детоксикация фенола в воде зафиксирована при УФ облучении раствора эксилампой с $\lambda_{\text{изл}} = 308$ нм без ГВ. Самое коротковолновое излучение ($\lambda_{\text{изл}} = 222$ нм) увеличивало токсичность образца по сравнению с исходным раствором фенола как в присутствии ГВ, так без них.

Для выявления наилучшего способа утилизации *пара*-крезола (4-метилфенола), его растворы подвергались не только действию ГВ и УФ облучения, но и микробиологической деградации микромицетом *Penicillium tardum* Н-2. На рисунке 8 представлены значения $(I/I_0)_F$ в исследуемых растворах, подвергшихся воздействию детоксицирующих факторов и их комбинаций.

Из рисунка видно, что раствор *пара*-крезола ингибирует интенсивность биолюминесценции бактерий ($(I/I_0)_F = 0,02$, столбец 1, Рис.8), что говорит о токсичности раствора *пара*-крезола. При добавлении ГВ в раствор *пара*-крезола наблюдается его детоксикация, $K=9,5$ (столбец 2, Рис.8). Коэффициенты детоксикации K всех растворов после биodeградации растворов максимально высокие (столбцы 6-13, Рис.8). Другие способы обработки также детоксицировали раствор *пара*-крезола ($K > 1$, столбцы 3, 4), за исключением облучения $\lambda_{\text{изл}} = 222$ нм в отсутствии ГВ, $K = 0,7$ (столбец 5, Рис.8).

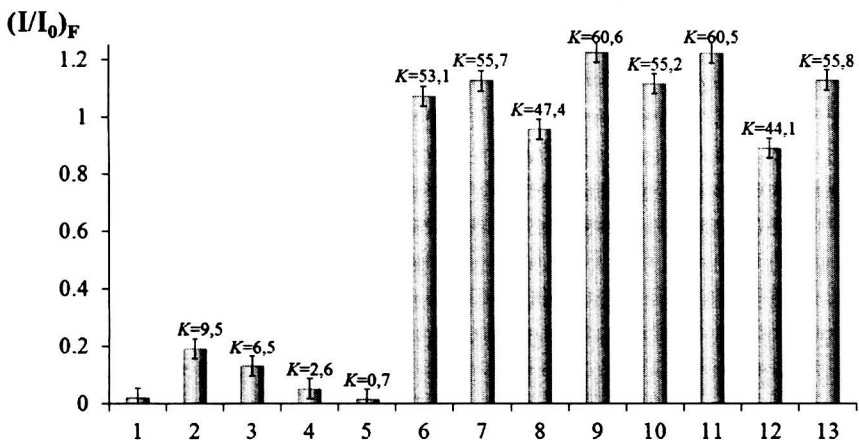


Рис. 8. Интенсивность биолюминесценции бактерий *P. phosphoreum* в растворах пара-крезола ($C=10^{-3}$ М): без ГВ (1, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12) и в присутствии ГВ (2, 7, 9, 11, 13) до облучения (1, 2, 6, 7) и после облучения: $\lambda_{\text{чзл}} > 350$ нм (3, 8, 9); $\lambda_{\text{чзл}} = 308$ нм (4, 10, 11); $\lambda_{\text{чзл}} = 222$ нм (5, 12, 13); после обработки микроскопическими грибами (6-13).

Полученные результаты демонстрируют эффективность использования биолюминесцентного биотеста для мониторинга процессов детоксикации различными факторами и их комбинацией.

ВЫВОДЫ

1. Продемонстрировано использование биолюминесцентных тестовых систем (лиофилизированных и интактных бактерий, системы сопряженных ферментативных реакций, катализируемых бактериальными ферментами люцифераза и НАД(Ф)Н-ФМН-оксидоредуктаза) для мониторинга процессов детоксикации различными факторами – обработкой гуминовыми веществами, УФ облучением, биологическими агентами.
2. На основе (а) связи коэффициентов детоксикации со стандартными окислительно-восстановительными потенциалами ряда хинонов и соответствующих им дифенолов, (б) сравнения воздействия гуминовых веществ и низкомолекулярного восстановителя (сульфита натрия) на растворы хинонов продемонстрирована окислительно-восстановительная активность гуминовых веществ в растворах органических редокс-активных соединений.

3. Методом электронной микроскопии обнаружено, что гуминовые вещества способны усиливать защитный ответ клетки на воздействие органических токсикантов путем интенсификации синтеза слизистого слоя внешней клеточной оболочки.
4. Показано, что эффективность детоксикации растворов фенолов различными факторами (УФ облучением, обработкой ГВ-ами и биологическим агентом) варьируется при изменении длины волны облучения и комбинации факторов.
5. Зарегистрирована фотоиндуцированная детоксикация растворов фенолов (гидроксibenзола и *пара*-крезола) при облучении УФ эксилампой с $\lambda_{\text{взл}}=308$ нм и УФ+видимым светом ($\lambda_{\text{взл}}>350$ нм). Коротковолновое УФ излучение ($\lambda_{\text{взл}}=222$ нм) увеличивало токсичность растворов. Микробиологическая деградация приводила к максимальной детоксикации растворов *пара*-крезола.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в реферируемых журналах:

1. Федорова Е.С., Кудряшева Н.С., А.М. Кузнецов А.М., Д.И. Стом Д.И., Белый А.В., Сизых А.Г. Детоксикация растворов органических окислителей гуминовыми веществами. Биolumинесцентный мониторинг. *Доклады Академии Наук*, 2005, Т.403, №4, С.554-556.
2. Чайковская О.Н., Соколова И.В., Светличный В.А., Кудряшева Н.С., Федорова Е.С. Люминесцентный анализ фотоиндуцированной детоксикации фенола. *Журнал Прикладной Спектроскопии*, 2006, Т.73, №6, С.665-670.
3. Федорова Е.С., Кудряшева Н.С. Детоксикация органических окислителей гуминовыми веществами. *Известия. Вузов. Физика*, 2006, Т.49, №3, С.172-174.
4. Tchaikovskaya O.N., Sokolova I.V., Svetlichnyi V.A., Karetnikova E.A., Fedorova E.S., Kudryasheva N.S. Fluorescent and bioluminescent analysis of sequential biological UV degradation of *p*-cresol in water, *Luminescence*, 2007, Vol.22, N1, P. 29-34.
5. Fedorova E.S., Kudryasheva N.S., Kuznetsov A.M., Mogilnaya O.A., Stom D.I. Bioluminescent monitoring of detoxication processes: Activity of humic substances in quinone solutions, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2007, Vol. 88, N2-3, P.131-136.
6. Чайковская О.Н., Каретникова Е.А., Соколова И.В., Федорова Е.С., Кудряшева Н.С. Люминесцентные исследования деградации 2-метилфенола и 4-метилфенола в воде. *Известия вузов. Физика*, 2008, Т.51, №12, С.1344-1355.

7. Tarasova A.S., Kudryasheva N.S., **Fedorova E.S.**, Stom D.I. Bioluminescent monitoring: detoxification of phenol solutions by humic substances and UV-irradiation. *Journal of Siberian Federal University. Biology*, 2008, Vol.1, N2, P.136-144.

Патент РФ № 2376380, от 20.12.2009. Кудряшева Н.С., **Федорова Е.С.** Биолюминесцентный способ определения антиоксидантной активности гуминовых веществ. Заявка №2007124565, приоритет от 29.06.2007.

Тезисы конференций:

1. **Fedorova E.S.**, Kudryasheva N.S., Kuznersov A.M., Stom D.I. Bioluminescent monitoring of toxicity of pollutants in the presence of humates // International School for Young Scientists and Students on Optics, Laser Physics and Biophysics, (Saratov Fall Meeting, 2003) Internet report and abstract are available at <http://optics.sgu.ru/SFM/2003/internet>.
2. **Федорова Е.С.**, Кудряшева Н.С., Кузнецов А.М. Биолюминесцентный мониторинг токсичности поллютантов в присутствии гуматов // 41-ая Международная Научная Студенческая Конференция «Студент и научно-технический прогресс», апрель 2003, Новосибирск, Россия, С.78.
3. **Федорова Е.С.**, Кудряшева Н.С., Кузнецов А.М. Изучение токсичности поллютантов в присутствии гуматов. Биолюминесцентный мониторинг // 10-ая Всероссийская Студенческая Научная Конференция «Экология и проблемы защиты окружающей среды», апрель, 2003, Красноярск, Россия, С.156.
4. **Федорова Е.С.**, Кудряшева Н.С., Кузнецов А.М. Исследование влияния гумата на токсичность поллютантов с помощью биолюминесцентного биотеста // Научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых-физиков, 16 апреля 2004, Красноярск, Россия, С.187.
5. **Федорова Е.С.**, Кудряшева Н.С., Кузнецов А.М. // Биолюминесцентный мониторинг. Анализ детоксикации органических и неорганических поллютантов с помощью гумата // 10-ая Всероссийская Научная Конференция Студентов Физиков, апрель 2004, Москва, Россия, С.231.
6. **Федорова Е.С.**, Кудряшева Н.С., Кузнецов А.М., Стом Д.И. Изменение токсичности поллютантов в присутствии гуматов. Биолюминесцентный мониторинг // III Съезд биофизиков России, 24-29 июня 2004, Воронеж, Россия, 76-77.
7. **Fedorova E.S.**, Kudruasheva N.S., Kuznetsov A.M., Stom D.I. The use of luminescence assay to study pollutant detoxication mechanism by humic substances.

- // VI International conference "Environment Pollution - 2005", September 20-25, 2005, Perm-Kazan-Perm, Russia, C.241.
8. **Федорова Е.С.**, Кудряшева Н.С., Кузнецов А.М., Стом Д.И. Использование люминесцентных биотестов для изучения механизма детоксикации поллютантов гуминовыми веществами // IX Дальневосточная молодежная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии, 16-23 сентября 2005, Владивосток, Россия, С.95.
 9. **Федорова Е.С.**, Кудряшева Н.С. VII Международная школа-семинар молодых ученых "Актуальные проблемы физики, технологий и инновационного развития", 6-8 декабря 2005, Томск, Россия, С.172.
 10. **Федорова Е.С.** Детоксикация поллютантов гуминовыми веществами. Биолуминесцентный мониторинг // XII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов- 2005", апрель 2005, Москва, Россия, С.165.
 11. **Fedorova E.S.**, Kudryasheva N.S., Kuznetsov A.M., Vydryakova G.A., Stom D.I.. Detoxification of Substituted Quinone Solutions by Humic Substances. // 13th Meeting of the International Humic Substances Society, July 30-August 4, 2006, Karlsruhe, Germany, P.1073-1077.
 12. Kudryasheva N.S., **Fedorova E.S.**, Rozhko T.N., Tchaykovskaya O.N., Sokolova I.V., Svetlichniy V.A., Bioluminescent monitoring of detoxification process. Abstract of XII Int. Symposium on Luminescence Spectrometry, Lugo, Spain, 18-21 July, 2006, P. 38.
 13. **Федорова Е.С.**, Кудряшева Н.С., Могильная О.А. Детоксикация органических окислителей гуминовыми веществами. // Российская школа-конференция Экоотоксикология - Современные биоаналитические системы, методы и технологии", 28 октября-3 ноября, 2006, г. Пушкино, Россия, С.131.
 14. Tarasova A.S., **Fedorova E.S.**, Kudryasheva N.S. General and oxidative toxicity of oxidizer in the presence of humic substances. Bioluminescent monitoring. // XVI International Symposium Bioluminescence and Chemiluminescence, France, Lyon, Luminescence, 2010, V.25, N2, P.136-137.

Формат 60х90/16. Заказ 1468. Тираж 100 экз. Усл.-печ. л. 1,2.

Печать офсетная. Бумага для множительных аппаратов.

Отпечатано в ООО "ФЭД+", Москва, Ленинский пр. 42, тел. 774-26-96

